СО замораживали с медленной скоростью до -196° С и хранили при этой температуре в течение 1 года (срок наблюдения). Было установлено, что основная гибель клеток происходила на этапах замораживания-отогрева. Более высокая жизнеспособность наблюдалась при замораживании под защитой ДМСО (43-45%).Сохранность клеток в питательной среде 199 без ДМСО составляла 23-26%.

Сам процесс хранения при постоянной температуре жидкого азота (-196° С), дополнительной гибели клеток, замороженных с криопротектором и без него, не вызывал.

SUMMARY

During cryopreservation of human fibroblasts slow freezing in 199 medium with adding 10% DMSO as cryoproptectant provides higher survival rate. Storage process at -196° C does not cause an additional cell death.

Т.И. Акимочкина

Астраханский Государственный Университет

ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ СПЕРМИЕВ РЫБ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ ИХ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТОЯНИЯ ПОСЛЕ ХРАНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ СВЕРХНИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

В проблеме сохранения генофонда редких и исчезающих видов рыб многие научные коллективы России используют традиционную криотехнологию, где основным хладоагентом для хранения репродуктивных клеток животных является жидкий азот. При замораживании основным фактором повреждения спермиев и других клеток является напряжение, возникающее в результате кристаллизации воды. Чтобы предотвратить деструктивное влияние на клетки сверхнизкой температуры, перед замораживанием к нативной сперме добавляют искусственную среду сложного состава, которая служит криопротектором. В современной литературе опубликовано много работ по вопросам изучения криозащитных свойств различных веществ. Эффективность протекторов обычно оценивают по времени и количеству (в %) подвижных клеток. Как правило подвижность спермиев после дефростации резко снижается, но по опубликованным в последние годы данным оплодотворяющая способность их сохраняется.

С целью изучения возможности оплодотворения нативной икры севрюги дефростированной спермой в 2005 году нами были проведены экспериментальные исследования на Кизанском рыбоводном заводе Астраханской области. После размораживания подвижность спермиев была крайне низкой, а количество активных клеток составило не более одного процента. Несмотря на столь низкую подвижность спермиев нами зарегистрирована не только оплодотворяемость, но и выклев личинок. Вероятно, оплодотворение произошло за счет диффузии спермиев в яйцеклетку.

Важно отметить, что оплодотворяемость икры была выше, чем выклев личинок, который составил несколько процентов от общего количества икры. Полученные нами предварительные данные исследований в принципе согласуются с опубликованными в научной литературе фактическими материалами.

Таким образом, кроме подвижности спермиев их качество после хранения в условиях сверхнизкой температуры следует также оценивать по морфологическим признакам.

С этой целью мы использовали способы световой микроскопии мазков спермы. После получения спермы от производителей приготавливали мазок на предметном стекле, таким же приемом, как и для приготовления мазков крови. Мазок спермы подсушивают на воздухе, фиксируют в этаноле и окрашивают гематоксилин-эозином. Затем краску смывают, ополаскивая водой, и высушивают. Микроскопируют клетки в иммерсионном масле при увеличении 7×90. В ходе микроскопии регистрируют следующие показатели:

- равномерность распределения клеток на мазке;
- отмечают степень слипания клеток (агрегация);
- регистрируют характер и распространение повреждения головной и хвостовой частей клеток;
- обращают внимание на различие размеров головной части клетки и другие изменения, по сравнению с контролем (исходная сперма до замораживания).

Техника и способы приготовления и микроскопирования мазков для дефростированной спермы те же, что и для мазков нативной спермы.

С помощью описанной методики нами были апробировано шесть из 15-и криопротекторов, качество которых предполагается оценить окончательно по оплодотворяющей способности спермиев.

Возможности микроскопической оценки качества спермиев довольно широкие. В настоящее время в нашей лаборатории в сотрудничестве с другими научными коллективами мы разрабатываем гистохимические методики для выявления различных химических соединений (нуклеопротеиды, липиды, гидролазы и т.д.), а также методы анализа на субклеточном уровне (электронная микроскопия).

Таким образом, изложенный выше способ оценки качества спермы с помощью световой микроскопии до и после криоконсервации репродуктивных клеток вполне доступен в любых условиях, не требует дорогостоящей аппаратуры. Данный способ, возможно, использовать в различных направлениях развития рыбоводства.

SUMMARY

Experimental data by definition of sperm quality of stellate sturgeon after storage of a seed liquid are submitted at temperature - 196° C. Quality of man›s gametes estimated by sperm smear microscopic examination and by impregnating ability of sperm after defrostation.

А.А. Андреев, Д.Г. Садикова, Е.А. Назина, Э.Н. Гахова

Институт биофизики клетки РАН

ОБРАЗОВАНИЕ ЛЬДА ПРИ ЗАМЕРЗАНИИ КРИОЗАЩИТНЫХ РАСТВОРОВ

Устойчивость к криоповреждениям спермы у разных видов рыб кардинально различается. Единой методики криоконсервации для рыб нет, т.к. среда обитания сильно различается для разных видов (например, морские и пресноводные виды, проходные и оседлые рыбы и т.д.). Если для морских рыб, устойчивых к высокому осмотическому давлению окружающей воды, удается получить высокие показатели выживания спермиев после процедуры замораживания-оттаивания без особых затруднений, то для проходных и пресноводных видов приходится искать уникальные способы и методы криоконсервации, особые криозащитные среды для каждого вида, причем процент подвижных клеток после оттаивания обычно невелик (Maisse, 1996). Способы криоконсервации различаются обычно: а) по составу основного криозащитного раствора и наличию дополнительных компонентов (сахара, белки, яичный желток, липиды; б) по скоростям охлаждения; в) используемому криопротектору; г) объему замораживаемого материала. Считается, что существенную роль в криоповреждении могут играть кристаллы льда, формирующихся при замерзании криозащитных растворов. Образование кристаллов льда наряду с другими негативными факторами (осмотический шок, латеральная диффузия липидов и белков, рекристаллизация при оттаивании, токсичность растворов криопротекторов) значительно снижает выживаемость клеток после процедуры замораживания-оттаивания при криоконсервации живых клеток и, в частности, сперматозоидов (Пушкарь, Грищенко, 1994).

В связи с этим мы исследовали насколько коррелирует размер и форма кристаллов льда, образующихся при замерзании криозащитных растворов и выживаемость спермиев, влияние скорости замерзания, объема пробы и добавочных компонентов среды (сахара, яичный желток) на образование кристаллов льда при замерзании криозащитных растворов, и на сохранение физиологических свойств спермиев рыб (осетр, белорыбица).